

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP0019839

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D.	06 NOV 2000
WIPO	PCT

4

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 49 000.7

Anmeldetag: 11. Oktober 1999

Anmelder/Inhaber: BASF AG, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

IPC: C 12 N, A 01 H, C 07 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. September 2000  
 Deutsches Patent- und Markenamt  
 Der Präsident  
 im Auftrag



Nietiedt

## Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase, dadurch gekennzeichnet, daß diese DNA-Sequenz die Nukleotidabfolge SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 aufweist.  
5
2. DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 gemäß Anspruch 1 oder Teilen davon oder Derivaten, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen Sequenzen abgeleitet sind, hybridisieren und für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.  
10
3. Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die eine Teilsequenz von mindestens 100 Aminosäuren aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 darstellt.  
15
4. Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die Teilsequenz 100 - 450 aus SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 enthält.  
20
5. Protein nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aminosäuresequenz die in SEQ-ID No. 2 oder SEQ-ID No. 4 dargestellte Sequenz enthält.  
25
6. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Einführung in pro- oder eukaryontische Zellen, wobei diese Sequenz gegebenenfalls mit Steuerelementen, die die Transkription und Translation in den Zellen gewährleisten, verknüpft ist und zur Expression einer translatierbaren mRNA, die die Synthese einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase bewirkt, führt.  
30
7. Verwendung einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung.  
35
8. Testsystem basierend auf der Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung.  
40

45

1125/99 K/Bei 11.10.1999

2

9. Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden hergestellt durch zusätzliche Expression einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 nach Anspruch 1 oder 2 in Sense- oder Antisense-Orientierung.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

## Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Identifizierung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase (Phosphoribosyl-pyrophosphat-Amidotransferase, E.C. 2.4.2.14) als neues Ziel für herbizide Wirkstoffe. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin DNA-Sequen-

10 zen kodierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure kodierend für ein Protein mit PRPP-Amidotransferase Aktivität pflanzlichen Ursprungs zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der PRPP-Amidotrans-  
15 ferase mit herbizider Wirkung. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäure SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 kodierend für pflanzliche PRPP-Amidotransferase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase, sowie zur Herstellung von Pflanzen mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden.

Pflanzen sind in der Lage, aus Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Salzen ihre Zellkomponenten zu synthetisieren.

25 Dieser Prozeß ist nur möglich, indem biochemische Reaktionen zum Aufbau organischer Substanzen genutzt werden. Nukleotide werden in Pflanzen *de novo* synthetisiert. Als Bestandteil der Nukleinsäuren kommt ihnen besondere Bedeutung zu. In kovalenter Bindung aktivieren Nukleotide Kohlenhydrate für die Biosynthese von Poly-  
30 sacchariden. Ferner aktivieren sie Kopfgruppen für die Biosynthese von Lipiden. Nukleotide sind in nahezu alle Stoffwechselwege eingebunden. Nucleosidtriphosphate, vor allem ATP, treiben die meisten energieaufwändigen Reaktionen der Zelle. Adenin-nukleotide sind darüber hinaus auch als Komponente in  
35 essentiellen Faktoren wie Coenzym A, sowie Nicotinamid- und Flavin-Coenzymen zu finden, die an vielen zellulären Reaktionen beteiligt sind. Die gekoppelte Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) definiert für diverse zelluläre Prozesse, wie Proteintranslation, Microtubuli-Assemblierung, vesikulären  
40 Transport, Signaltransduktion und Zellteilung eine Reaktionsrichtung. Ferner stellen Nukleotide die Ausgangsmetabolite zur Biosynthese von Methylxanthinen wie Coffein und Theobromin in Pflanzenfamilien der Rubiaceae und Theaceae dar.  
45 Gene, die für PRPP-Amidotransferase kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen isoliert.

CDNAs die für PRPP-Amidotransferase Enzyme codieren konnten aus diversen bakteriellen, tierischen und pflanzlichen Organismen isoliert und charakterisiert werden. Pflanzliche PRPP-Amidotransferase cDNAs wurden über Komplementation von *E. coli* purF-Mutanten sowie über DNA-Hybridisierungstechniken aus *Glycine max*, *Vigna aconitifolia* sowie aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; Kim et al., The Plant Journal 7(1995), 77-86). Sequenzhomologien deuten darauf hin, daß die codierten Enzyme, ebenso wie PRPP-Amidotransferase aus *E. coli* 4Fe-4S-Cluster enthalten. Die im Vergleich zu *E. coli* N-terminal verlängerten PRPP-Amidotransferase Aminosäuresequenzen aus Pflanzen ähneln plastidären Signalsequenzen.

In Pflanzen finden sich mehrere PRPP-Amidotransferase Isoenzyme, die differentiell exprimiert werden. Die RNA für AtATase1 aus *Arabidopsis thaliana* akkumuliert beispielsweise präferentiell in den Wurzeln, während die AtATase2-Transkripte stärker in jungen Blättern und Blüten gefunden wird (Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533). In *Vigna aconitifolia* accumuliert eine PRPP-Amidotransferase RNA hauptsächlich in Wurzelknöllchen und wird in Wurzelgeweben durch L-Glutamin induziert (Kim et al., The Plant Journal 7(1995), 77-86).

Da Pflanzen auf einen effektiven Nukleotidstoffwechsel angewiesen sind, läßt sich annehmen, daß sich die beteiligten Enzyme als Ziel für Herbizide eignen. So wurden bereits Wirkstoffe beschrieben, welche die pflanzliche de novo Purinbiosynthese inhibieren. Beispielhaft ist der Naturstoff Hydanthocidin zu nennen, welcher nach Phosphorylierung in planta die Adenylosuccinat-Synthetase (ASS), inhibiert (Siehl et al., Plant Physiol. 110(1996), 753-758).

Inhibitoren für Enzyme der Purin-Biosynthese sind darüber hinaus für ihre pharmakologische Wirkung in Tieren und Mikroorganismen bekannt: Folat-Analoga inhibieren unter anderem das Enzym GAR-Transformylase und wirken antiproliferativ, antiinflammatorisch und immunosuppressiv. Mycophenolsäure (MPA) wirkt als Hemmstoff der IMP-Dehydrogenase im GMP-Syntheseweg antimikrobiell, antiviral und immunosuppressiv (Kitchin et al., Journal of the American Academy of Dermatology 37(1997), 445-449).

Bakterielle PRPP-Amidotransferase kann beispielsweise durch Glutaminantagonisten, wie Azaserin, 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucin (DON) oder L-2-Amino-4-Oxo-5-Chlorpentansäure sowie durch Mercaptopurine und Thioquanosine gehemmt werden. Glutaminantagonisten sind nicht spezifisch für PRPP-Amidotransferase und wirken auch auf andere Enzyme der Purinbiosynthese, wie z.B. die Formylglycinami-

dinribotid-Synthase. Ein Nachweis der Wirksamkeit von Glutamimantagonisten auf pflanzliche PRPP-Amidotransferase steht noch aus.

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es zu belegen, daß PRPP-Amidotransferase in Pflanzen ein geeignetes herbizides Target ist, die Isolierung einer vollständigen pflanzlichen cDNA kodierend für das Enzym PRPP-Amidotransferase und deren funktionelle Expression in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen, sowie die

10 Herstellung eines effizienten und einfachen PRPP-Amidotransferase Testsystems für die Durchführung von Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien.

15 Die Aufgabe wurde gelöst durch Isolierung von Genen, die für das pflanzliche Enzym PRPP-Amidotransferase kodieren, der Herstellung von Antisensekonstrukten der PRPP-Amidotransferase, sowie der funktionellen Expression der PRPP-Amidotransferase in bakteriellen oder eukaryontischen Zellen.

20 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Isolierung von Vollängen-cDNAs codierend für funktionelle PRPP-Amidotransferase (E.C.2.4.2.14) aus Tabak (*Nicotiana tabacum*).

25 Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 enthaltend die Kodierregion einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase aus Tabak, siehe Beispiel 1.

30 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind DNA-Sequenzen, die von SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 abgeleitet sind oder mit einer dieser Sequenzen hybridisieren und die für ein Protein kodieren, das die biologische Aktivität einer PRPP-Amidotransferase besitzt.

35 Tabakpflanzen der Linie *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN, die ein Antisensekonstrukt der PRPP-Amidotransferase tragen, wurden näher charakterisiert. Die Pflanzen zeigen in unterschiedlichem Maße eine Wachstumsretardierung, sowie ein Ausbleichen der Blätter.

40 Die transgenen Linien sowie die Nachkommen der 1. und 2. Generation wiesen ein verringertes Wachstum in Erde auf. In Pflanzen mit verringertem Wachstum konnte eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte PRPP-Amidotransferase RNA-Menge in der Northern-Hybridisierung detektiert werden. Ferner konnte durch Messung der

45 Enzymaktivität eine im Vergleich mit Wildtyppflanzen verringerte Menge der PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien detektiert werden, siehe Beispiel 7. Es läßt sich eine

Korellation zwischen Wachstumsretardierung und Reduktion der PRPP-Amidotransferase Aktivität feststellen. Dieser klare Zusammenhang weist PRPP-Amidotransferase erstmals eindeutig als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

5

Um effiziente Hemmstoffe der pflanzlichen PRPP-Amidotransferase finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die kom-

10 plette cDNA-Sequenz der PRPP-Amidotransferase aus Tabak in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli* überexprimiert, siehe Beispiel 2.

Alternativ kann jedoch die Expressionskassette enthaltend eine  
15 DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID NO. 3 beispielsweise in anderen Bakterien, in Hefen, Pilzen, Algen, Pflanzenzellen, Insektenzellen oder Säugetierzellen exprimiert werden, siehe Beispiel 4.

20 Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette exprimierte PRPP-Amidotransferase Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die PRPP-Amidotransferase spezifischen Hemmstoffen.

25 Dazu kann die pflanzliche PRPP-Amidotransferase beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der PRPP-Amidotransferase in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen lässt sich eine qualitative und quantitative Aus-  
30 sage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen, siehe Beispiel 3.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Substanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

40

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren pflanzlicher PRPP-Amidotransferasen, mit potentiell herbizider Wirkung indem man das Gen einer pflanzlichen PRPP-Amidotransferase kloniert, in einer geeigneten Expressionskassette - beispielsweise in Insektenzellen - zur Überexpression bringt, die Zellen öffnet und den Zellextrakt direkt bzw. nach Anreicherung oder Isolierung des Enzyms PRPP-Amido-

transferase in einem Testsystem zur Messung der Enzymaktivität in Gegenwart von niedermolekularen chemischen Verbindungen einsetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen mit 5 herbizider Wirkung, die mit dem oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

~~Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können als Defoliants, Desiccants, Krautabtötungsmittel und ins-~~  
10 ~~besondere als Unkrautvernichtungsmittel verwendet werden. Unter Unkraut im weitesten Sinne sind alle Pflanzen zu verstehen, die an Orten aufwachsen, an denen sie unerwünscht sind. Ob die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems gefundenen Wirkstoffe als totale oder selektive Herbizide wirken, hängt unter anderem von~~  
15 ~~der angewandten Menge ab.~~

~~Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase mit herbizider Wirkung können beispielsweise gegen folgende Unkräuter verwendet werden:~~

20 Dikotyle Unkräuter der Gattungen:  
Sinapis, Lepidium, Galium, Stellaria, Matricaria, Anthemis, Galinsoga, Chenopodium, Urtica, Senecio, Amaranthus, Portulaca, Xanthium, Convolvulus, Ipomoea, Polygonum, Sesbania, Ambrosia, Cirsium, Carduus, Sonchus, Solanum, Rorippa, Rotala, Lindernia, 25 Lamium, Veronica, Abutilon, Emex, Datura, Viola, Galeopsis, Papaver, Centaurea, Trifolium, Ranunculus, Taraxacum.

Monokotyle Unkräuter der Gattungen:

30 Echinochloa, Setaria, Panicum, Digitaria, Phleum, Poa, Festuca, Eleusine, Brachiaria, Lolium, Bromus, Avena, Cyperus, Sorghum, Agropyron, Cynodon, Monochoria, Fimbristylis, Sagittaria, Eleocharis, Scirpus, Paspalum, Ischaemum, Sphenoclea, Dactyloctenium, Agrostis, Alopecurus, Apera.

35 Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren Sequenz für eine PRPP-Amidotransferase aus Tabak oder deren funktionelles Äquivalent kodieren. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein.

40 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, 45 einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für

das PRPP-Amidotransferase-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

Die Herstellung einer erfundungsgemäßen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten PRPP-Amidotransferase-DNA Sequenz und einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungs-techniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Gegenstand der Erfindung sind auch funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 40 bis 25 100 % aufweisen.

Bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 60 30 bis 100 % aufweisen.

Besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind funktionell äquivalente DNA-Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen 35 kodieren und die bezogen auf die Gesamtlänge der DNA-Sequenz eine Sequenzhomologie mit der DNA-Sequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 von 80 bis 100 % aufweisen.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein PRPP-Amidotransferase Gen kodieren, sind erfundungsgemäß solche Sequenzen, welche 40 trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine PRPP-Amidotransferase kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfas-  
5 sen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorlie-  
gende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation dieser Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann  
10 z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-  
Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funk-  
15 tion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abge-  
schwächt oder verstärkt ist.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamen-  
20 tösen Pilzen und Algen mit dem Ziel der Herstellung von ausrei-  
chenden Mengen des Enzyms PRPP-Amidotransferase eingesetzt wer-  
den.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein aus Tabak ge-  
25 kennzeichnet durch die Aminosäuresequenz SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID No. 4 bzw. Derivate oder Teile dieses Proteins mit PRPP-Amido-  
transferase Aktivität.

Gegenstand der Erfindung sind auch pflanzliche Proteine mit PRPP-  
30 Amidotransferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu der Tabak PRPP-Amidotransferase mit den SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 20 - 100 % Identität.

Bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amidotransferase  
35 Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den Tabak PRPP-  
Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 50 - 100 % Identität.

Besonders bevorzugt sind pflanzliche Proteine mit PRPP-Amido-  
40 transferase Aktivität mit einer Aminosäuresequenzhomologie zu den Tabak PRPP-Amidotransferasen mit den Sequenzen SEQ-ID NO: 2 oder SEQ-ID NO. 4 von 80 - 100 % Identität.

Weitere Aufgabe der Erfindung war die Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Pflanzen zur Herstellung von Pflanzen, die tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase sind.

5

Durch Überexpression der für eine PRPP-Amidotransferase kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO. 1 oder SEQ-ID NO. 3 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase erreicht. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten PRPP-Amidotransferase Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung oder durch einen Keimungstest ermittelt werden.

15 Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des PRPP-Amidotransferase Gens und deren Auswirkung auf die Resistenz gegenüber Hemmstoffen der PRPP-Amidotransferase an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

20 Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3, die durch zusätzliche Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 tolerant gegenüber Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase 25 geworden sind, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, sowie Leguminosen.

30 Eine Veränderung des Nukleotidgehaltes in Pflanzen kann in verschiedenen Fällen von Nutzen sein. Säuglingsnahrungsprodukten auf pflanzlicher Basis werden beispielsweise Nukleotide zugesetzt, um 35 eine der Muttermilch entsprechende Nährstoffzusammensetzung zu erreichen. Weiterhin wäre ein optimierter Nukleotidgehalt im Falle der enteralen Ernährung von Patienten sinnvoll. Ein reduzierter Purin-Nukleotidgehalt in ernährungsrelevanten Pflanzen ist für die diätetische Ernährung Gicht-kranker Patienten relevant. Nukleotide wirken ferner geschmacksbildend und geschmacksverstärkend, so daß sich ein veränderter Nukleotidgehalt auf geschmackliche Eigenschaften von Pflanzen auswirkt.

40 Weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher Pflanzen, die nach Expression der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in der Pflanze einen modifizierten Gehalt an Purinnukleotiden aufweisen. Dabei wird vorzugsweise der Gehalt der Purinnukleotide IMP, AMP

und/oder GMP bzw. deren Di- bzw. Trinukleotide ADP, ATP oder GDP, GTP erhöht.

Eine Pflanze mit modifiziertem Gehalt an Purinnukleotiden wird 5 beispielsweise durch Expression einer zusätzlichen DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 oder SEQ-ID No. 3 in sense- oder antisense-Orientierung in der Pflanze hergestellt. Modifizierter Gehalt an Purinnukleotiden bedeutet, daß sowohl Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Purinnukleotiden bei sense-Orientierung als auch Pflanzen mit er- 10 niedrigtem Gehalt an Guanosinnukleotiden bei sense-Orientierung (Cosuppression) oder antisense-Orientierung hergestellt werden können.

Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden bedeutet beispielsweise 15 im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung für Purinnukleotide durch funktionelle Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung pflanzlicher PRPP-Amidotransferase zur Veränderung der Konzentrationen von Methylxanthinen in Pflanzen.

25 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant 30 Sci. 15, 4 (1996), 285-423).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Pflanzen-Transformationsvektor pBinAR eingebaut werden, siehe Beispiel 5.

35 Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der 40 einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21(1980), 285-294). Dieser Promotor enthält unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des 45 eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren 5 wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant.Mol. Biol. (1993) 22, 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesufonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., Plant J. (1992) 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzier- 10 barer (EP0335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-indu- zierbarer (WO 93/21334) Promotor sind in der Literatur beschrie- ben und können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesonders solche Promotoren bevorzugt, die die 15 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Purinen bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kar- 20 toffel (Stockhaus et al., EMBO J., (1989) 8, 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors kann ein Fremdprotein 25 stabil bis zu einem Anteil von 0,67% des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert wer- den (Fiedler und Conrad, Bio/Technology (1995) 10, 1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin- Promotor, den USP- oder LEB4-Promotor), das LEB4-Signalpeptid, 30 das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

30 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine PRPP-Amido- transferase kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Be- standteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleo- 35 tid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt wer- den. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den mei- sten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA- 40 Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhal- ten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Ver- bindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beispielsweise beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Gehaltes an Purinnukleotiden in der Pflanze durch Überexpression des PRPP-Amidotransferase Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die PRPP-Amidotransferase Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

15

Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches PRPP-Amidotransferase Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf PRPP-Amidotransferase Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulatorische Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das PRPP-Amidotransferase Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Zweckmäßigerweise sollten die erfindungsgemäßen Promotor- und die 30 Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb 35 der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdarig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans-

versionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden 5 der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, ins- 10 besondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835) oder funktionelle Äquivalente.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine PRPP- 15 Amidotransferase kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulat- onssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Inte- gration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in 20 "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press, Kapitel 6/7, 71-119) beschrieben.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen 25 Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten- transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, der biolistische Ansatz mit der Genkanone, die Elektroporation, 30 die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentrans- fer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und 35 R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu trans- formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 40 12 (1984), 8711).

Mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transforma- tion von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, 45 Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies sowie Leguminosen

13

verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

5 Der Biosyntheseort von Purinen ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des PRPP-Amidotransferase Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Purin-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in 10 fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen PRPP-Amidotransferase Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

15

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionsketten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung 25 einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des PRPP-Amidotransferase Gehaltes in der Pflanze.

30 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Beispiele

40

Gentechnische Verfahren, die den Ausführungsbeispielen zugrunde liegen:

Allgemeine Klonierungsverfahren

45

Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen,

5 Anzucht von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(1977), 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

#### Analyse von Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben:

20 Gesamt-RNA aus pflanzlichen Geweben wurde wie bei Logemann et al. (Anal. Biochem. 163(1987), 21) isoliert. Für die Analyse wurden jeweils 20 µg RNA in einem Formaldehyd-haltigen 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylon Membranen (Hybond, Amersham) überführt. Der Nachweis spezifischer Transkripte wurde wie bei 25 Amasino beschrieben durchgeführt (Anal. Biochem. 152(1986), 304). Die als Sonde eingesetzten DNA-Fragmente wurden mit einem Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim) radioaktiv markiert und nach Standardmethoden hybridisiert (Siehe Hybond-Benutzerhinweise, Amersham). Hyridisierungssignale wurden durch Auto- 30 radiographie mithilfe von X-OMAT AR Filmen der Fa. Kodak sichtbar gemacht.

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders erwähnt, in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden mit aufbereitetem, pyrogenfreiem Wasser, im weiteren Text als H<sub>2</sub>O bezeichnet, aus einer Milli-Q Water System Wasseraufbereitungsanlage (Millipore, Eschborn) angesetzt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und 40 molekularbiologische Kits wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Roche (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg) Qiagen (Hilden) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, nach Herstellerangaben verwendet.

15

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (E. coli, XL-1 Blue) wurden von Stratagene bezogen. E. coli AT 2465 wurde bei dem coli genetic stock centre (Yale University, New Haven) bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (Agrobacterium tumefaciens, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kan) wurde von Deblaere et al. beschrieben (Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777). Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33(1985), 103-119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12(1984), 8711-8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221-230) benutzt werden.

### 15 Beispiel 1

Isolierung von cDNAs codierend für eine funktionelle PRPP-Amidotransferase aus Tabak.

20 Zur Isolierung von für PRPP-Amidotransferase codierenden cDNAs aus Nicotiana tabacum wurde ein für PRPP-Amidotransferase codierender cDNA-Klon aus *Arabidopsis* (AtATase1; Ito et al., Plant Molecular Biology 26(1994), 529-533; GenBank Accession number D28868) als Matrize zur Erzeugung einer Hybridisierungssonde 25 mittels PCR verwendet.

Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/µl Matrizen DNA, 0,5 µM der Oligonukleotide 5'-cgc tct aga act agt gga tc-3' und 5'-tcg agg tcg acg gta tc-3', 200 µM Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 30 mM KC1, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) und 0,02 U/µl Taq Polymerase (Perkin Elmer).

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

35 Anlagerungstemperatur:	50°C, 1 min
Denaturierungstemperatur:	94°C, 1 min
Elongationstemperatur:	72°C, 2 min
Anzahl der Zyklen:	30

40 Das resultierende Fragment von 1,9 kb wurde für ein heterologes Screening einer cDNA Bank von Nicotiana tabacum var. SR-1 (Stratagene) verwendet. Es wurden 3,0 x 10<sup>5</sup> Lambda Phagen der cDNA-Bibliothek auf Agarplatten mit E. coli XL1-blue als Bakterienstamm ausplattiert. Die Phagen-DNA wurde mittels Standardverfahren 45 (Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) auf Nitrocellulosefilter (Gelman Sciences) überführt und auf den Filtern fixiert. Als Hybridisierungssonden

diente das oben beschriebene PCR-Fragment, das mit Hilfe des "Multiprime DNA labelling systems" (Amersham Buchler) in Anwesenheit von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben radioaktiv markiert wurden. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte nach Prähybridisierung bei 60°C in 3 x SSPE, 0,1% Natriumdodecylsulfat (w/v), 0,02% Polyvinylpyrolidon (w/v), 0,02% Ficoll 400 (w/v) und 50 mg/ml Kalbsthymus DNA für ca. 12 Stunden. Anschließend wurden die Filter 60 Minuten in 2 x SSPE, 0,1% Natriumdodecylsulfat (w/v) bei 60°C gewaschen. Positiv hybridisierende Phagen wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht und mittels Standardtechniken vereinzelt (Sambrook et al. (1989); Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) und in Plasmide überführt (Strategene).

15 Nach Restriktions- und Sequenzanalyse konnten zwei unterscheidbare Klone Ntpur1.1 (Klon 7.2) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und Ntpur1.2 (Klon 9.2) enthaltend die DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 identifiziert werden, welche Leseraster mit Homologie zu AtATAsel aus *Arabidopsis thaliana* codieren. Die Aminosäuresequenzen von Ntpur1.1 (SEQ-ID No. 2 - Länge: 573 Aminosäuren) und Ntpur1.2 (SEQ-ID No. 4 - Länge: 573 Aminosäuren) sind zu 97 % identisch, siehe Tabelle 1. Die Homologie auf Aminosäureebene zu AtATAsel beträgt für Ntpur1.1 81 % und für Ntpur1.2 85 %. Die durchgehenden Leseraster beginnen mit Nukleotidbase 49 (Ntpur1.1) bzw. 25 (Ntpur1.2) und werden in Polypeptide von 573 Aminosäuren Länge übersetzt.

Tabelle 1

## 30 Aminosäurevergleich Ntpur1.1 x Ntpur1.2:

	1	MAATVSTASAAATNKSPPLSQPLDKPFCSPSQKLLSLSPKTLPKPYRTLVT	50
	1	MAATVSTASAAATNKYPLSQPLDKPFCSSLQKLLSLSPKTHPKPYRTLIT	50
35	51	ASSKNPLNDVVSFKKSADNTLDSYFDDDEDKPREECGVVGIYGDSEASRLC	100
	51	ASSKNPLNDVISFKKSADNTLDSYFDDDDKPREECGVVGIYGDSEASRLC	100
	101	YLALHALLHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM	150
40	101	YLALHALQHRGQEGAGIVAVNDDVLKSITGVGLVSDVFNESKLDQLPGDM	150
	151	AIGHVWYSTAGSSMLKNVQPFVANYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRGELEE	200
	151	AIGHVRYSTAGSSMLKNVQPFVASYKFGSVGVAHNGNLVNYKLLRSELEE	200
45	201	NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDK	250
	201	NGSIFNTSSDTEVVLHLIAISKARPFLRIVEACEKIEGAYSMVFVTEDK	250
	251	LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVVFASETCALDLIEATYEREVNPGEV	300

17

251 LVAVRDPHGFRPLVMGRRSNGAVFASETCALDLIEATYEREVNPGEVVV 300  
301 VDKDGVHSIYLMPHPEHKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL 350  
5 301 VDKDGVQSICLMPHPERKSCIFEHIYFALPNSVVFGRSVYESRRAFGEIL 350  
351 ATEAPVECDVGIAPDSGIVAALGYAAKAGVPFQQGLIRSHYVGRTFIEP 400  
351 ATEAPVECDVVIAPDSGVVAALGYAAKAGVPFQQGLIRSHYVGRTFIEP 400  
10 401 SQKIRDFGVKLKLSPVRALLEGKRVVVVDDSVIRGTTSSKIVRLLKEAGA 450  
401 SQKIRDFGVKLKLSPVRAVLEGKRVVVVDDSVIRGTTSSKIVRLLKEAGA 450  
451 KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL 500  
451 KEVHMRIASPPIIASCYYGVDTPSSDELISNRMSVEEIKEFIGSDSLAFL 500  
15 501 PMDSLNLKLLGNDSKSFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS 550  
501 PMDSLNLKLLGNDSKSFCYACFSGNYPVEPTGKVKRIGDFMDDGLSGDMDS 550  
551 IDGGWLPGSSRVQKTIILNEVRTG 573  
20 551 IDGGWLPGSSRVQKTIILNEVRTS 573

Die pflanzlichen Proteine (Ntpur1.1, Ntpur1.2, AtATase1) weisen gegenüber PRPP-Amidotransferase Sequenzen von Bakterien und Mensch einen verlängerten N-Terminus mit einem großen Anteil basischer Aminosäuren auf (Tabelle 2), was auf die Funktion eines Transitpeptides für den plastidären Import hinweist (von Heijne et al., Eur. J. Biochem. 180 (1989), 535-545).

Tabelle 2

30

Sequenzgegenüberstellung PRPP-Amidotransferase Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (AtATase1), *Bacillus subtilis* (BacSu\_purF), Mensch (pur1\_hum) und *Nicotiana tabaccum* (Ntpur1.1, Ntpur1.2)

35

18

BacSu_purF	GLNEECGVFG	IWGHEE....	APQITYYG	LHSLQHRCQE	GAGIVATDGE	
Ntpur1	KPREECGVVG	IYGDSE....	ASRLCYLA	LHALLHRCQE	GAGIVAVN.D	
Ntpur1-2	KPREECGVVG	IYGDSE....	ASRLCYLA	LHALQHRCQE	GAGIVAVN.D	
pur1_hum	GIREECGVFG	CIASGEWPTQ	LDVPHVITLG	LVGLQHRCQE	SAGIVTSDGS	
		151				200
5						
	AtATase1	KV..LQTITG	VGLVSEVFNE	SKLDQL.PGE	FAIAHVRYST	AGASMLKNVQ
	BacSu_purF	K...LTAHKG	QGLITEVFQN	GELSKV.KGK	GAIGHVRYST	AGGGGYENVQ
	Ntpur1	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVWYST	AGSSMLKNVQ
	Ntpur1-2	DV..LKSITG	VGLVSDVFNE	SKLDQL.PGD	MAIGHVRYST	AGSSMLKNVQ
	pur1_hum	SVPTFKSHKG	MGLVNHVFTE	DNLKKLYVSN	LGIGHTRYAT	TGKCELENCQ
		201				250
10						
	AtATase1	PFV.AGYRFG	SIGVAHNGNL	VNYKTLRAML	EENGSIANTS	SDTEVVLHLI
	BacSu_purF	PLLFRSQNNG	SLALAHNGNL	VNATQLKQQL	ENQGSIFQTS	SDTEVLAHLI
	Ntpur1	PFV.ANYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRGEL	EENGSIANTS	SDTEVVLHLI
	Ntpur1-2	PFV.ASYKFG	SVGVAHNGNL	VNYKLLRSEL	EENGSIANTS	SDTEVVLHLI
	pur1_hum	PFVVETLH.G	KIAVAHNGEL	VNAARLRKKL	LRHGIGLSTS	SDSEMITQLL
		251				300
15						
	AtATase1	AISKAR....	..PFFMRIID	ACEKLQGAYS	MVFVTEDKLV	AVRDPYGFPRP
	BacSu_purF	KRSGHF....	..TLKDQIKN	SLSMLKGAYA	FLIMTETEMI	VALDPNGLRP
	Ntpur1	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTEDKLV	AVRDPHGFPRP
	Ntpur1-2	AISKAR....	..PFLLRIVE	ACEKIEGAYS	MVFVTEDKLV	AVRDPHGFPRP
	pur1_hum	AYTPPQEQQD	TPDWVARIKN	LMKEAPTAYS	LLIMHRDVYI	AVRDPYGNRP
		301				350
20						
	AtATase1	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVYPGEV
	BacSu_purF	LSIGM.....	.....M	GD.AYVVASE	TCAFDDVVGAT	YLREVEPGEM
	Ntpur1	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
	Ntpur1-2	LVMGR.....	.....R	SNGAVVFASE	TCALDLIEAT	YEREVNPGEV
	pur1_hum	LCIGRLIPVS	DINDKEKKTS	ETEGWVVSSE	SCSFLSIGAR	YYREVLPGEI
		351				400
25						
	AtATase1	LVVDKDGVK	QCLMPKFEPK	Q...CIFEHI	YFSLPNSIVF	GRSVYESRHV
	BacSu_purF	LIINDEGMKS	ERFSMNNINRS	I...CSMEYI	YFSRPDSNID	GINVHSARKN
	Ntpur1	VVVDKDGVHS	IYLMPHPEHK	S...CIFEHI	YFALPNVVF	GRSVYESRRA
	Ntpur1-2	VVVDKDGQVS	ICLMPHPERK	S...CIFEHI	YFALPNVVF	GRSVYESRRA
	pur1_hum	VEISRHNQQT	LDIISRSEGN	PVAFCIFEYV	YFARPDSMFE	DQMVTYR
		401				450
30						
	AtATase1	FGEILATESP	VECDVVIAP	DSGVVAALGY	AAKSGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	BacSu_purF	LGKMLAQESA	VEADVVTGVP	DSSISAAIGY	AEATGIPYEL	GLIKNRYVGR
	Ntpur1	FGEILATEAP	VECDVGIAVP	DSGIVVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	Ntpur1-2	FGEILATEAP	VECDVVIAP	DSGVVAALGY	AAKAGVPFQQ	GLIRSHYVGR
	pur1_hum	CGQQLAIEAP	VDADLVSTVP	ESATPAALAY	AGKCGLPYVE	VLCKNRYVGR
		451				500
35						
	AtATase1	TFIEEPSQKIR	DFGVKLKLSP	VRGVLEGKRV	VVVDDSIVRG	TTSSKIVRLL
	BacSu_purF	TFIQPSQALR	EQGVRMKLSA	VRGVVEGKRV	VMVDDSIVRG	TTSRIVTML
	Ntpur1	TFIEEPSQKIR	DFGVKLKLSP	VRALLEGKRV	VVVDDSIVRG	TTSSKIVRLL
	Ntpur1-2	TFIEEPSQKIR	DFGVKLKLSP	VRAVLEGKRV	VVVDDSIVRG	TTSSKIVRLL
	pur1_hum	TFIQPNMRLR	QLGVAKKFGV	LSDNFKGKRI	VLVDDSIVRG	NTISPIIKLL
		501				550
40						
	AtATase1	REAGAKEVHM	RIASPPIVAS	CYYGVDTTPSS	EELISNRSLV	EEINEFIGSD
	BacSu_purF	REAGATEVHV	KISSPPIAHP	CFYGIDTSTH	EELIASSHSV	GEIRQEIGAD
	Ntpur1	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
	Ntpur1-2	KEAGAKEVHM	RIASPPIIAS	CYYGVDTTPSS	DELISNRMSV	EEIKEFIGSD
	pur1_hum	KESGAKEVHI	RVASPPIKYP	CFMGINIPKT	EELIANKPEF	DHLAEYLGAN
45						

	AtATase1	SLAFLSFDTL	KKHL.....	.....	.....	GK...	DSK.SFCYA
	BacSu_purF	TLSFLSVEGL	LKGI.....	.....	.....	GRKYD	DSNCGQCLA
	Ntpur1	SLAFLPMDSL	NKLL.....	.....	.....	GN...	DSK.SFCYA
5	Ntpur1-2	SLAFLPMDSL	NKLL.....	.....	.....	GN...	DSK.SFCYA
	purl_hum	SVVYLSVEGL	VSSVQEGIKF	KKQKEKKHDI	MIQENGNGLE	CFEKGSHCTA	
			601				650
<hr/>							
	AtATase1	CFTGDPVVP	TEVKVKRGGG	DFIDDDGLVGS	FENIEAGWVR	-----	-----
	BacSu_purF	CFTGKYPTEI	YQDTVLPHVK	EAVLTK	-----	-----	-----
10	Ntpur1	CFSGNYPVEP	TG.KVKR.IG	DFMDDGLSGD	MDSIDGGWLP	GSSRVQKTL	
	Ntpur1-2	CFSGNYPVEP	TG.KVKR.IG	DFMDDGLSGD	MDSIDGGWLP	GSSRVQKTL	
	purl_hum	CLTGKYPVEL	EW	-----	-----	-----	
			651				
	AtATase1	-----					
	BacSu_purF	-----					
	Ntpur1	NEVRTG					
15	Ntpur1-2	NEVRTS					
	purl_hum	-----					

## Beispiel 2

20 Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in E.coli

Mit dem Ziel, die Aktivität des durch Ntpur1.2 codierten PRPP-Amidotransferase Enzyms nachzuweisen, wurde Ntpur1.2 in E.coli exprimiert. Dazu wurde in einer (PCR) mit Pfu-Polymerase mit den Oligonucleotiden Jle336: 5'-tttgctagcgactcgatggacg-3' und Jle337: 5'-aaaaagatctcagggtctaaattcat -3' und Ntpur1.2-DNA als Matrize ein Fragment von 1523 bp amplifiziert. Das erzeugte DNA-Fragment codiert für ein N-terminal um 86 Aminosäuren verkürztes PRPP-Amidotransferase Enzym, welches das anzunehmende Transitpeptid nicht mehr enthält. Diese verkürzte Form des PRPP-Amidotransferase Enzyms beginnt N-terminal mit den Aminosäuren MDSYFDDDD. Mittels der Oligonucleotide wurden eine NheI-Schnittstelle sowie eine BglIII-Schnittstelle eingefügt, über die das erzeugte Fragment in den mit NheI und BamHI gespaltenen Expressionsvektor pET11a (Novagen) ligiert wurde.

35 Zur Expression wurde der E.coli Stamm BL21(DE3)LySS (Novagen) mit dem auf diese Weise erzeugten Konstrukt pETNtpur1.2 transformiert. Nach Übernachtkultur wurde eine Tageskultur auf OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> = 0,7 mit 1mM IPTG induziert. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode ("French-Press") in 50mM Tris-HCl, pH 7,4; 150mM NaCl erzeugt. Ein überexprimiertes Protein von ca. 65 kDa wurde nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten. Das Protein wurde zur Erzeugung von Antiseren in Kaninchen injiziert (im Auftrag durchgeführt durch die Firma Eurogentec, Herstal, Belgien).

20

## Beispiel 3

Testsystem zur Messung der Aktivität pflanzlicher PRPP-Amido-transferase Aktivität

5

Die vorbeschriebene Methode zur Messung pflanzlicher PRPP-Amido-transferase Aktivität nach Reynolds et al. (Archives of Biochemistry and Biophysics 229 (1984), 623-631) ist aufgrund der Verwendung radioaktiver Substrate nicht für eine Testung im Hoch-10 durchsatz geeignet. Es wurde daher auf Basis der bei Shid und Is-  
hii (Journal of Biological Chemistry 66 (1969), 175-181) für PRPP-Amidotransferase aus E.coli beschriebenen Methode ein alternatives Testsystem entwickelt, mit dem die pflanzliche PRPP-Ami-  
dotransferase Aktivität im Proteinextrakt anhand der Bildung des 15 Reaktionsproduktes Glutamat nachgewiesen wird. Die Konzentration des entstehenden Glutamats wird dabei durch Umsetzung mit Gluta-  
mat-Dehydrogenase (GluDH) und photometrische Verfolgung der APADH-Bildung bei 363 nm gemessen.



(PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat, PRA = Phosphoribosylamin,  
25 APAD = 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid, PRAT = PRPP-Amido-  
transferase)

Dazu wurde der Reaktionsansatz (s.u.) für bis zu 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 5-minütige Inkubation bei 30 95°C gestoppt.

Reaktionsansatz:

375 $\mu$ L	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
35 75 $\mu$ L	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
75 $\mu$ L	30 mM	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
75 $\mu$ L	100 mM	L-Glutamin
50 $\mu$ L		H <sub>2</sub> O
<u>100 <math>\mu</math>L</u>		Proteinextrakt
40 750 $\mu$ L		

Der Nachweis des gebildeten Glutamats erfolgte im Nachweisansatz (s.u.) durch photometrische Messung der APADH-Zunahme bei 363 nm nach Zugabe der Glutamat-Dehydrogenase.

## Nachweisansatz:

375 $\mu$ L	100 mM	Tris/HCl-Puffer pH 8.0
75 $\mu$ L	500 mM	KCl
5 125 $\mu$ L		H <sub>2</sub> O
75 $\mu$ L	3 mM	APAD
<u>100 <math>\mu</math>L</u>		des Reaktionsansatzes
750 $\mu$ L		

10 Start der Nachweisreaktion mit 2  $\mu$ l (ca. 4 Units) Glutamat Dehydrogenase (Sigma).

Das Testsystem eignet sich in besonderer Weise zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität aus Pflanzenmaterial und in Expressionsextrakten zum Beispiel aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen.

## Beispiel 4

20 Funktionale Expression von PRPP-Amidotransferase aus Tabak in Insektenzellen

Zur Expression von Ntpur1.1 in Baculovirus-infizierten Insektenzellen wurde das Bac-to-Bac Expressionssystem der Firma GibcoBRL eingestzt. Dazu wurde Ntpur1.1 für eine PCR eingesetzt. Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/ $\mu$ l Ntpur1.1 DNA, 0,5  $\mu$ M der Oligonukleotide 5'-tat agg atc cat gga ctc cta ttt tga cg-3' und 5'-atg aat tct agc tgg ttc taa ctt c-3', 200  $\mu$ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 0.04 U/ $\mu$ l Pfu Polymerase (Stratagene) und wurde auf 30 Pufferbedingungen nach Angaben des Herstellers eingestellt.

Die Amplifikationsbedingungen wurden wie folgt eingestellt:

## Step 1:

35

Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min  
Anlagerungstemperatur: 40°C, 0,5 min  
Elongationstemperatur: 72°C, 2 min  
Anzahl der Zyklen für Step 1: 2

40

## Step 2:

Denaturierungstemperatur: 95°C, 0,5 min  
Anlagerungstemperatur: 50°C, 0,5 min  
45 Elongationstemperatur: 72°C, 3 min  
Anzahl der Zyklen für Step 2: 25

Das PCR-Produkt wurde in den mit StuI geschnittenen Vector pFast-Bac1 (GibcoBRL) ligiert. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde durch Kontrollverdau mit KpnI sichergestellt. Der erhaltene Transfervector pFastBacNtpurl.2 wurde nach Herstellerangaben zur 5 Erzeugung rekombinanter Baculoviren mittels Sf21 Insektenzellen (Invitrogen) verwendet. Mit dem rekombinanten Baculovirus (BvNtpurl.2) wurden Sf21 Insektenzellen infiziert. Die Zellen wurden nach 2-4 Tagen durch Zentrifugation geerntet. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnte im Gesamtextrakt ein Pro- 10 tein von ca. 54kDaL entsprechend der erwarteten Größe der PRPP-Amidotransferase identifiziert werden. Ein Gesamtzellextrakt wurde nach der Druckaufschlußmethode ("French-Press") in Extraktionspuffer (100 mM HEPES pH 8,0; 2,5 mM EDTA; 10 % Glycerol; 20 mM DTE; 0,2 mM PEFA-Block) erzeugt und nach Entsalzung über eine 15 PD10-Säule (Pharmacia) zur Messung der PRPP-Amidotransferase Aktivität im beschriebenen Assay (siehe Beispiel 3) verwendet.

#### Beispiel 5

#### 20 Erzeugung von Vektoren zur Pflanzentransformation

Zur Erzeugung binärer Vektoren für die Pflanzentransformation wurde der Klon Ntpurl.1 mit SmaI und EcoRV gespalten und ein 1482 bp umfassendes Fragment isoliert, welches in den mit SmaI gespaltenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66(1990), 221-230) ligiert wurde. Die auf diese Weise erhaltenen Antisense- bzw. Sense-Konstrukte wurden mit pBinAR-NtpurlA bzw. pBinAR-Ntpurl bezeichnet, siehe Abbildung 1.

#### 30 Beispiel 6

##### Erzeugung transgener Tabakpflanzen

Die Plasmide pBinAR-NtpurlA bzw. pBinAR-Ntpurl wurden in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 13(1984), 4777-4788). Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und 40 Skoog Physiol. Plant. 15(1962), 473) mit 2% Saccharose (2MS-Medium) benutzt. Blattscheiben steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 2-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 2MS-Medium mit 0,8% Bacto-Agar. 45 Die Kultivierung wurde nach 2 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Ka-

namycin, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylessigsäure und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

5

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer im 16 Stunden hell/8 Stunden dunkel-Rhythmus bei 60% Luftfeuchte auf PRPP-Amidotransferase Expression und -Aktivität sowie auf veränderte Metabolitgehalte und phänotypische Wachstumsmerkmale untersucht.

10 Veränderte Nukleotidgehalte können z.B. nach der Methode von Stitt et al., FEBS Letters 145 (1982), 217-222 bestimmt werden.

### 15 Beispiel 7

#### Analyse transgener Pflanzen

Transgene Pflanzen, die mit dem Konstrukt mit pBinAR-Ntpur1 transformiert wurden sind gekennzeichnet durch ein in unterschiedlichem Maße verringertes Wachstum sowie ein großflächiges Ausbleichen der Blätter im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen. Die RNA-Analyse durch die Northernblot-Technik wies in transgenen Linien mit dem beschriebenen Phänotyp eine 25 verringerte Menge an Ntpur1.1-RNA auf.

Um die Korrelation zur Wachstumsreduktion zu testen, wurde die PRPP-Amidotransferase Aktivität in den transgenen Linien gemessen und mit jener in untransformierten Kontrollen verglichen. Dazu 30 wurden je ca. 30 g Blätter von ca. 20 cm hohen Pflanzen mit 50 ml Extraktionspuffer bei +4 °C homogenisiert.

#### Extraktionspuffer:

35 100 mM HEPES pH 8,0  
2,5 mM EDTA  
10 % Glycerol  
20 mM DTE  
0,2 mM PEFA-Block (40mM)

40

Der Aufschlußextrakt wurde durch Miracloth (Calbiochem, Bad Soden) filtriert und bei 16000 rpm in der Sorval Zentrifuge zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bei 4°C gefällt. Die 30 % - 60 %-Stufe wurde im Extraktionspuffer 45 solubilisiert und über eine PD-10-Säule (Pharmacia, Schweden) entsalzt. Der so gewonnene Extrakt ist mindestens 24 h stabil, und kann bei -20 °C nach Zusatz von Glycerol (50% Endkonzentration)

24

tration) für längere Zeit gelagert werden. Der Extrakt kann direkt zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden.

Diese Daten stellen einen direkten Zusammenhang zwischen verrin-  
5 gerter PRPP-Amidotransferase Aktivität und verringertem Wachstum  
der Tabakpflanzen her und weisen daher PRPP-Amidotransferase  
erstmals als geeignetes Zielprotein für herbizide Wirkstoffe aus.

Beispiel 8

10

Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität

Zur Suche nach Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase Aktivität kann der in Beispiel 3 beschriebene *in vitro* Assay mit Hochdurch-  
15 satzmethoden verwendet werden. Die PRPP-Amidotransferase Aktivität kann dazu aus Pflanzengeweben präpariert werden, siehe Beispiel 7. Alternativ kann eine pflanzliche PRPP-Amidotransfe-  
rase in *E.coli*, Insektenzellen oder einem anderen geeigneten Ex-  
pressionssystem exprimiert werden. Auf diese Weise wurden be-  
20 kannte PRPP-Amidotransferase Inhibitoren - wie Glutaminantagoni-  
sten - identifiziert.

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> PRPP-Amidotransferase aus Pflanzen

<130> NAE991125

---

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1879

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(1767)

<400> 1

ctagcccccc acttgctttt ccttctgtcc tcctttttc caccgccc atg gcc gcc 57

Met Ala Ala

1

acc gtc tcc acc gcc tct gcc gcc acc aat aaa tct cct ctt tcg 105

Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser Pro Leu Ser

5

10

15

ag ccc ctc gac aaa ccc ttt tgc tcc cca tct caa aag ctc tta tct 153

Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys Leu Leu Ser

20

25

30

35

tta tcc cct aaa acc ctc cca aaa ccc tat aga act ctc gtc acc gca 201

Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Val Thr Ala

40

45

50

tct tcc aaa aac ccc tta aac gac gtc gtt tcg ttt aag aaa tca gct 249

Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Val Ser Phe Lys Lys Ser Ala

55

60

65

gac aat aca ttg gac tcg tat ttt gac gat gaa gac aaa ccc cgt gaa 297

Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Glu Asp Lys Pro Arg Glu

70

75

80

gag tgt ggc gtt gtg ggc atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt 345  
Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu  
85 90 95

tgc tat tta gca ctt cac gcg ctt cta cac cgt ggc caa gaa ggc gcc 393  
Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Leu His Arg Gly Gln Glu Gly Ala  
100 105 110 115

ggc att gtc gcc gtt aac gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt 441  
Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val  
120 125 130

ggg tta gta tcc gac gtg ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct 489  
Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro  
135 140 145

gt gac atg gca att ggc cac gtc tgg tac tct act gct ggc tct tct 537  
Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Trp Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser  
150 155 160

atg tta aaa aat gtt cag cct ttt gtt gct aat tat aaa ttt ggg tca 585  
Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Asn Tyr Lys Phe Gly Ser  
165 170 175

gtt ggt gtt gcc cat aat ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt 633  
Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg  
180 185 190 195

ggt gaa cta gaa gag aat ggg tca att ttt aat acg agt tct gat act 681  
Gly Glu Leu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr  
200 205 210

aa gtg gta ctt cac ctt att gct ata tcg aaa gct agg cct ttt tta 729  
Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu  
215 220 225

ttg agg att gtt gag gct tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg 777  
Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met  
230 235 240

gtg ttt gtt act gag gat aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg 825  
Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly  
245 250 255

ttt agg cca ttg gtt atg ggt agg aga agt aat ggt gct gtt ttt 873  
Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe  
260 265 270 275

gcg tcg gag acg tgt gct ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg	921		
Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg			
280	285	290	
gag gtg aat cct ggt gag gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cat	969		
Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val His			
295	300	305	
tct att tat ttg atg cct cat ccc gag cat aaa tct tgt atc ttt gag	1017		
Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys Ile Phe Glu			
310	315	320	
cat att tac ttt gct ctg cct aat tcg gtc gtg ttt ggg agg tct gtg	1065		
His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly Arg Ser Val			
325	330	335	
ata gag tct agg cgt gct ttt gga gag att ctt gcg act gaa gct ccc	1113		
Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr Glu Ala Pro			
340	345	350	355
gta gaa tgt gat gtt ggg ata gca gtt cct gat tcg ggt atc gtg gct	1161		
Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly Ile Val Ala			
360	365	370	
gcg ctc ggt tat gct gct aaa gcg ggg gta ccg ttt caa caa ggt ttg	1209		
Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln Gln Gly Leu			
375	380	385	
ata agg tcg cat tat gtt ggt agg aca ttt atc gag ccg tcg cag aag	1257		
Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro Ser Gln Lys			
390	395	400	
ata agg gat ttc ggg gtg aag ctt aag ttg tca cca gtt agg gca tta	1305		
Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val Arg Ala Leu			
405	410	415	
ttg gag ggg aaa agg gtt gtg gtc gtg gac gat tca atc gtt aga ggg	1353		
Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Asp Asp Ser Ile Val Arg Gly			
420	425	430	435
acg acc tcg tcc aag att gtg agg ttg ttg aag gag gcg ggt gcg aaa	1401		
Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala Gly Ala Lys			
440	445	450	
gag gtt cat atg agg att gca agc cca cca att ata gct tct tgt tat	1449		
Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala Ser Cys Tyr			
455	460	465	

tat gga gtg gat act cct agt tca gat gag ctg ata tca aat agg atg 1497  
Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser Asn Arg Met  
470 475 480

agt gtg gag gag att aag gag ttc att gga tcg gat tcg ctt gct ttt 1545  
Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser Leu Ala Phe  
485 490 495

ctg cca atg gat agc ttg aat aag ttg tta ggc aat gat tct aaa agc 1593  
Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser  
500 505 510 515

ttt tgc tat gct tgc ttt tcg ggc aat tac ccg gtc gag ccg acg ggt 1641  
Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly  
520 525 530

aag gtt aaa agg att ggg gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat 1689  
Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp  
535 540 545

atg gat tcc att gat ggt ggt tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa 1737  
Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln  
550 555 560

aag act atc ttg aat gaa gtt aga acc ggc taaaactttct tttccatgtt 1787  
Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly  
565 570

tgcttttagtt tttgccttgg atttctaatg cttgactata gaaattataa gtttcaatga 1847

agtctctttt tctaaaaaaaaaaaaaaaaaa aa 1879

<210> 2  
<211> 573  
<212> PRT  
<213> Nicotiana tabacum

<400> 2  
Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Ser  
1 5 10 15

Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Pro Ser Gln Lys  
20 25 30

Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr Leu Pro Lys Pro Tyr Arg. Thr Leu  
35 40 45

Val	Thr	Ala	Ser	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Asn	Asp	Val	Val	Ser	Phe	Lys
50															
							55					60			
Lys	Ser	Ala	Asp	Asn	Thr	Leu	Asp	Ser	Tyr	Phe	Asp	Asp	Glu	Asp	Lys
65							70					75			80
Pro	Arg	Glu	Glu	Cys	Gly	Val	Val	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ala
						85					90			95	
Ser	Arg	Leu	Cys	Tyr	Leu	Ala	Leu	His	Ala	Leu	Leu	His	Arg	Gly	Gln
						100					105			110	
Glu	Gly	Ala	Gly	Ile	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Asp	Val	Leu	Lys	Ser	Ile
						115					120			125	
Thr	Gly	Val	Gly	Leu	Val	Ser	Asp	Val	Phe	Asn	Glu	Ser	Lys	Leu	Asp
						130					135			140	
Gln	Leu	Pro	Gly	Asp	Met	Ala	Ile	Gly	His	Val	Trp	Tyr	Ser	Thr	Ala
145						150					155			160	
Gly	Ser	Ser	Met	Leu	Lys	Asn	Val	Gln	Pro	Phe	Val	Ala	Asn	Tyr	Lys
						165					170			175	
Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Val	Ala	His	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Asn	Tyr	Lys
						180					185			190	
Leu	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu	Glu	Glu	Asn	Gly	Ser	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser
						195					200			205	
Ser	Asp	Thr	Glu	Val	Val	Leu	His	Leu	Ile	Ala	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg
						210					215			220	
Pro	Phe	Leu	Leu	Arg	Ile	Val	Glu	Ala	Cys	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly	Ala
225						230					235			240	
Tyr	Ser	Met	Val	Phe	Val	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Val	Ala	Val	Arg	Asp
						245					250			255	
Pro	His	Gly	Phe	Arg	Pro	Leu	Val	Met	Gly	Arg	Arg	Ser	Asn	Gly	Ala
						260					265			270	
Val	Val	Phe	Ala	Ser	Glu	Thr	Cys	Ala	Leu	Asp	Leu	Ile	Glu	Ala	Thr
						275					280			285	
Tyr	Glu	Arg	Glu	Val	Asn	Pro	Gly	Glu	Val	Val	Val	Val	Asp	Lys	Asp
						290					295			300	

Gly Val His Ser Ile Tyr Leu Met Pro His Pro Glu His Lys Ser Cys  
305 310 315 320

Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly  
325 330 335

Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr  
340 345 350

Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Gly Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly  
355 360 365

Ile Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln  
370 375 380

Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro  
385 390 395 400

Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val  
405 410 415

Arg Ala Leu Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile  
420 425 430

Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala  
435 440 445

Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala  
450 455 460

Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser  
465 470 475 480

Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser  
485 490 495

Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp  
500 505 510

Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu  
515 520 525

Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu  
530 535 540

Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser  
545 550 555 560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Gly  
565 570

<210> 3

<211> 1869

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(1743)

<400> 3

ctgtcctcat tttccacc accc atg gcc gcc acc gtc tcc acc gcc tct 51  
Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser  
1 5

gcc gcc gcc acc aac aaa tat cct ctt tca cag ccc ctt gac aaa ccc 99  
Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro  
10 15 20 25

ttt tgc tcc cta tct caa aag ctc tta tct tta tcc cct aaa acc cat 147  
Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His  
30 35 40

cct aaa ccc tac aga act ctc atc acc gcc tct tcc aaa aac ccc tta 195  
Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu  
45 50 55

aac gac gtc att tcg ttt aag aaa tca gct gac aat acc ttg gac tcc 243  
Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser  
60 65 70

tat ttt gac gat gac gat aaa ccc cgt gaa gag tgc ggc gtt gtg ggc 291  
Tyr Phe Asp Asp Asp Lys Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly  
75 80 85

atc tat ggc gac tca gaa gct tca cgc ctt tgc tat tta gca ctt cac 339  
Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His  
90 95 100 105

gcg ctt caa cac cgt ggc caa gaa ggc gcc ggc att gtc gcc gtt aac 387  
Ala Leu Gln His Arg Gly Gln Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn  
110 115 120

gac gac gtt ctt aag tca att aca ggt gtt ggg tta gta tcc gac gtg 435

Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val			
125	130	135	
ttc aat gag tca aag ctt gac caa ctc cct ggt gac atg gca att ggc	483		
Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly			
140	145	150	
cac gta agg tac tct act gct ggc tct tct atg tta aaa aat gtt cag	531		
His Val Arg Tyr Ser Thr Ala Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln			
155	160	165	
cct ttt gtt gct agt tat aaa ttt ggg tca gtt ggt gtt gcc cat aat	579		
Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn			
170	175	180	185
ggt aat tta gtg aat tat aag tta ctg cgt agt gaa cta gag gaa aat	627		
Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn			
190	195	200	
ggg tca att ttt aat aca agt tct gat act gag gtt gta ctt cac ctt	675		
Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu			
205	210	215	
att gct ata tct aaa gct agg cca ttt tta ttg agg att gtt gag gct	723		
Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala			
220	225	230	
tgt gaa aaa att gaa ggt gct tat tct atg gtg ttt gtt act gag gat	771		
Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp			
235	240	245	
aag ttg gtt gcc gta agg gat cct cat ggg ttt agg cca ttg gtt atg	819		
Lys Leu Val Ala Val Arg Asp Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met			
250	255	260	265
ggt agg aga agt aat ggt gct gtt ttg ttc gcg tct gag acg tgt gct	867		
Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala Val Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala			
270	275	280	
ttg gat ttg att gag gct act tat gag agg gag gtg aat cct ggt gag	915		
Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu			
285	290	295	
gtt gtt gtt gtg gat aaa gat ggg gtt cag tct att tgt ttg atg cct	963		
Val Val Val Val Asp Lys Asp Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro			
300	305	310	
cat cct gag cgt aaa tct tgt atc ttt gag cat att tac ttt gct ctg	1011		

His	Pro	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Ile	Phe	Glu	His	Ile	Tyr	Phe	Ala	Leu	
315																
																325
cct	aat	tcg	gtc	gtg	ttt	ggg	agg	tct	gtg	tac	gag	tct	agg	cgt	gct	1059
Pro	Asn	Ser	Val	Val	Phe	Gly	Arg	Ser	Val	Tyr	Glu	Ser	Arg	Arg	Ala	
330																345
ttc	ggg	gag	att	ctt	gct	act	gaa	gct	ccc	gtg	gaa	tgt	gat	gtt	gtg	1107
Phe	Gly	Ile	Leu	Ala	Thr	Glu	Ala	Pro	Val	Glu	Cys	Asp	Val	Val		
350																355
360																
ata	gca	gtt	cct	gac	tcg	ggt	gtc	gtg	gct	gcg	ctc	ggt	tat	gct	gct	1155
Ile	Ala	Val	Pro	Asp	Ser	Gly	Val	Val	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ala	
365																370
375																
aaa	gca	ggg	gta	ccg	ttt	caa	caa	ggt	ttg	att	agg	tcg	cat	tat	gtt	1203
Lys	Ala	Gly	Val	Pro	Phe	Gln	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Ser	His	Tyr	Val	
380																385
390																
ggt	agg	acg	ttc	atc	gag	cca	tcg	cag	aag	ata	agg	gat	ttc	ggg	gtg	1251
Gly	Arg	Thr	Phe	Ile	Glu	Pro	Ser	Gln	Lys	Ile	Arg	Asp	Phe	Gly	Val	
395																400
405																
aag	ctt	aag	ctg	tcg	ccg	gtt	agg	gcg	gtg	ttg	gag	gga	aaa	aga	gtt	1299
Lys	Leu	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Arg	Ala	Val	Leu	Glu	Gly	Lys	Arg	Val	
410																415
420																425
gtg	gtc	gtg	gat	gtc	atc	gtt	aga	gga	acg	acc	tcg	tcc	aag	att		1347
Val	Val	Val	Asp	Asp	Ser	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Ile	
430																435
440																
gtg	agg	ctg	tta	aag	gag	gcg	ggt	gct	aaa	gag	gtt	cat	atg	agg	att	1395
Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Ala	Lys	Glu	Val	His	Met	Arg	Ile	
445																450
455																
gca	agc	cca	cca	att	ata	gct	tct	tgt	tat	tat	gga	gtg	gat	act	cct	1443
Ala	Ser	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Ser	Cys	Tyr	Tyr	Gly	Val	Asp	Thr	Pro	
460																465
470																
agt	tca	gat	gag	ttg	ata	tca	aat	agg	atg	agt	gtg	gag	gag	att	aag	1491
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Ile	Ser	Asn	Arg	Met	Ser	Val	Glu	Glu	Ile	Lys	
475																480
485																
gag	ttc	att	gga	tcg	gat	tcg	ctt	gct	ttt	ctg	cca	atg	gat	agc	ttg	1539
Glu	Phe	Ile	Gly	Ser	Asp	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Met	Asp	Ser	Leu	
490																495
500																505
aat	aag	ctc	tta	ggc	aat	gat	tct	aaa	agc	ttt	tgc	tat	gct	tgc	ttt	1587

Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe  
 510 515 520

tcg ggc aat tac cca gtc gag ccg acg ggt aag gtt aaa agg ata ggg 1635  
 Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly  
 525 530 535

---

gat ttc atg gat gat gga tta agt gga gat atg gat tcc att gat ggt 1683  
 Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly  
 540 545 550

gga tgg cta cca gga agt agt agg gtt caa aag act atc ttg aat gaa 1731  
 Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu  
 555 560 565

gtt aga acc agc taaaactttct tttccatgtt tgcttagtt tttgctttgg 1783  
 Val Arg Thr Ser  
 70

atttctaattg cttgaccata gaaattataa gtttcaatga agtctctttt tctatttgg 1843

atgcccacatg attctactga tctatg 1869

<210> 4  
 <211> 573  
 <212> PRT  
 <213> Nicotiana tabacum

<400> 4  
 Met Ala Ala Thr Val Ser Thr Ala Ser Ala Ala Ala Thr Asn Lys Tyr  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Pro Leu Asp Lys Pro Phe Cys Ser Leu Ser Gln Lys  
 20 25 30

Leu Leu Ser Leu Ser Pro Lys Thr His Pro Lys Pro Tyr Arg Thr Leu  
 35 40 45

Ile Thr Ala Ser Ser Lys Asn Pro Leu Asn Asp Val Ile Ser Phe Lys  
 50 55 60

Lys Ser Ala Asp Asn Thr Leu Asp Ser Tyr Phe Asp Asp Asp Asp Lys  
 65 70 75 80

Pro Arg Glu Glu Cys Gly Val Val Gly Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Ala  
 85 90 95

Ser Arg Leu Cys Tyr Leu Ala Leu His Ala Leu Gln His Arg Gly Gln  
100 105 110

Glu Gly Ala Gly Ile Val Ala Val Asn Asp Asp Val Leu Lys Ser Ile  
115 120 125

Thr Gly Val Gly Leu Val Ser Asp Val Phe Asn Glu Ser Lys Leu Asp  
130 135 140

Gln Leu Pro Gly Asp Met Ala Ile Gly His Val Arg Tyr Ser Thr Ala  
145 150 155 160

Gly Ser Ser Met Leu Lys Asn Val Gln Pro Phe Val Ala Ser Tyr Lys  
165 170 175

Phe Gly Ser Val Gly Val Ala His Asn Gly Asn Leu Val Asn Tyr Lys  
180 185 190

Leu Leu Arg Ser Glu Leu Glu Glu Asn Gly Ser Ile Phe Asn Thr Ser  
195 200 205

Ser Asp Thr Glu Val Val Leu His Leu Ile Ala Ile Ser Lys Ala Arg  
210 215 220

Pro Phe Leu Leu Arg Ile Val Glu Ala Cys Glu Lys Ile Glu Gly Ala  
225 230 235 240

Tyr Ser Met Val Phe Val Thr Glu Asp Lys Leu Val Ala Val Arg Asp  
245 250 255

Pro His Gly Phe Arg Pro Leu Val Met Gly Arg Arg Ser Asn Gly Ala  
260 265 270

Al Val Phe Ala Ser Glu Thr Cys Ala Leu Asp Leu Ile Glu Ala Thr  
275 280 285

Tyr Glu Arg Glu Val Asn Pro Gly Glu Val Val Val Val Asp Lys Asp  
290 295 300

Gly Val Gln Ser Ile Cys Leu Met Pro His Pro Glu Arg Lys Ser Cys  
305 310 315 320

Ile Phe Glu His Ile Tyr Phe Ala Leu Pro Asn Ser Val Val Phe Gly  
325 330 335

Arg Ser Val Tyr Glu Ser Arg Arg Ala Phe Gly Glu Ile Leu Ala Thr  
340 345 350

Glu Ala Pro Val Glu Cys Asp Val Val Ile Ala Val Pro Asp Ser Gly  
355 360 365

Val Val Ala Ala Leu Gly Tyr Ala Ala Lys Ala Gly Val Pro Phe Gln  
370 375 380

Gln Gly Leu Ile Arg Ser His Tyr Val Gly Arg Thr Phe Ile Glu Pro  
385 390 395 400

---

Ser Gln Lys Ile Arg Asp Phe Gly Val Lys Leu Lys Leu Ser Pro Val  
405 410 415

Arg Ala Val Leu Glu Gly Lys Arg Val Val Val Val Asp Asp Ser Ile  
420 425 430

Val Arg Gly Thr Thr Ser Ser Lys Ile Val Arg Leu Leu Lys Glu Ala  
435 440 445

Gly Ala Lys Glu Val His Met Arg Ile Ala Ser Pro Pro Ile Ile Ala  
450 455 460

Ser Cys Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Pro Ser Ser Asp Glu Leu Ile Ser  
465 470 475 480

Asn Arg Met Ser Val Glu Glu Ile Lys Glu Phe Ile Gly Ser Asp Ser  
485 490 495

Leu Ala Phe Leu Pro Met Asp Ser Leu Asn Lys Leu Leu Gly Asn Asp  
500 505 510

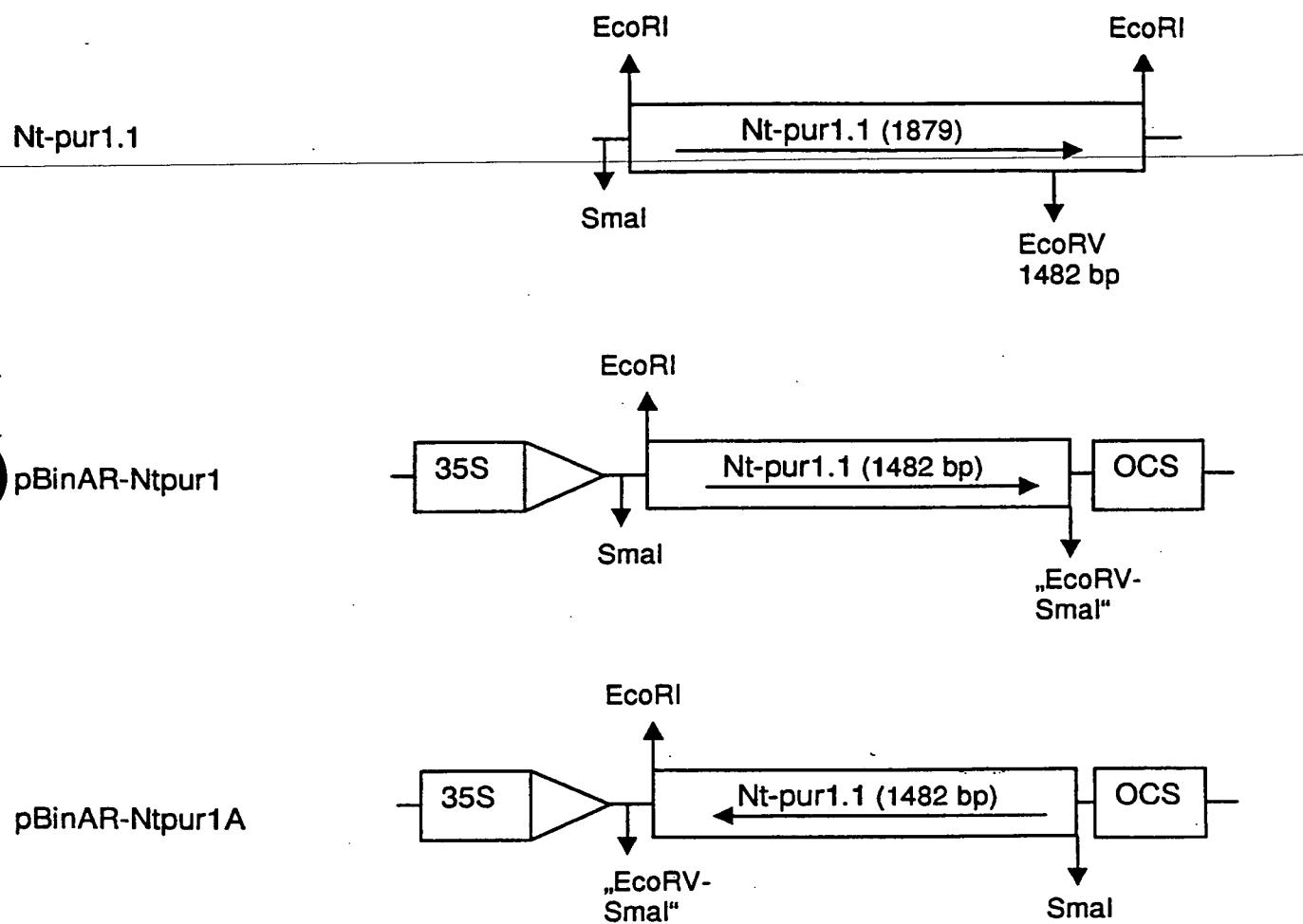
Ser Lys Ser Phe Cys Tyr Ala Cys Phe Ser Gly Asn Tyr Pro Val Glu  
515 520 525

Pro Thr Gly Lys Val Lys Arg Ile Gly Asp Phe Met Asp Asp Gly Leu  
530 535 540

Ser Gly Asp Met Asp Ser Ile Asp Gly Gly Trp Leu Pro Gly Ser Ser  
545 550 555 560

Arg Val Gln Lys Thr Ile Leu Asn Glu Val Arg Thr Ser  
565 570

Abbildung 1



## PRPP-Amidotransferase

## Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft DNA-Sequenzen codierend für ein Polypeptid mit PRPP-Amidotransferase (EC 2.4.2.14) Aktivität. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Nukleinsäuren zur Herstellung eines Testsystems.

10

15

20

25

30

35

40

45

